



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 19 056 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 196 19 056.8  
㉑ Anmeldetag: 3. 5. 96  
㉒ Offenlegungstag: 25. 9. 97

㉓ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 Q 1/32**  
C 12 Q 1/54  
G 01 N 33/15  
G 01 N 27/26  
// G 01 N 33/02, C 07 C  
31/18, 229/00, 59/08,  
C 07 H 3/02

DE 196 19 056 A 1

㉔ Innere Priorität:  
196 08 176.9 04.03.96

㉕ Anmelder:  
Scheller, Frieder, Prof., 16341 Zepernick, DE

㉖ Erfinder:  
Scheller, Frieder, Prof. Dr., 16341 Zepernick, DE;  
Scheller, Anne, 16341 Zepernick, DE; Gajovič,  
Nenad, 10785 Berlin, DE

㉗ Entgegenhaltungen:  
DE 44 07 449 A1  
DE 30 46 741 A1  
EP 02 02 743 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉘ Verfahren zur enzymatisch-elektrochemischen Bestimmung von Substraten  $\text{NAD}^{+}$ - und  $\text{NAD(P)}^{+}$ -abhängiger Dehydrogenasen

㉙ Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Sensor zur Bestimmung von Substraten  $\text{NAD}^{+}$ - und  $\text{NAD(P)}^{+}$ -abhängiger Dehydrogenasen.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß ein Analyt mit einer Dehydrogenase in Gegenwart von Salicylathydroxylase umgesetzt wird und die Bildung oder der Verbrauch von NADH oder NADPH als anodisches Stromsignal bei niedrigem Potential an einer Elektrode oder eine Anzeige mit einer einfachen Clark- $\text{O}_2$ -Elektrode gestattet.

Anwendungsgebiete der Erfindung liegen in der pharmazeutischen Analytik, der Lebensmittelindustrie und der Lebensmittelanalytik.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 97 702 039/542

9/25

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Sensor zur Bestimmung von Substraten  $\text{NAD}^+$ - und  $\text{NAD(P)}^+$  abhängiger Dehydrogenasen. Anwendungsgebiete der Erfindung liegen in der pharmazeutischen Analytik, der Lebensmittelindustrie und der Lebensmittelanalytik.

Die enzymatische Analytik basiert auf der biokatalytischen Umsetzung der zu bestimmenden Substanz unter Beteiligung eines gut meßbaren Reaktionspartners.

Die eingesetzten Enzyme führen dabei zu einer hohen Geschwindigkeit der Analytumsetzung auf Grund ihrer Funktion als Biokatalysator, so daß die Analysenzeit verkürzt werden kann. Weiterhin erlaubt häufig die Substratspezifität der Enzyme die Analytbestimmung in komplex zusammengesetzten Medien ohne eine vorherige Abtrennung von üblicherweise interferierenden Probestandteilen. Vor allem diese Aspekte haben dazu geführt, daß Enzyme in großem Umfang in der klinischen Diagnostik und Lebensmittelanalytik eingesetzt werden.

Unter den Enzymen, die in der Analytik eingesetzt werden, dominieren die Dehydrogenasen und die Oxidasen bei der Bestimmung von Stoffwechselprodukten wie Glucose, Lactat, Glycerol, Cholesterol. Hydrolasen und Transferasen spielen dagegen eine untergeordnete Rolle. Allein bei den Dehydrogenasen, die ihre Substrate unter Beteiligung des Cosubstrates  $\text{NAD(P)}^+$  bzw.  $\text{NAD(P)H}$  durch Redoxreaktionen umsetzen, sind mehr als 250 verschiedene Enzyme in der Enzymnomenklatur enthalten. Oxidasen, die Sauerstoff als Oxidationsmittel besitzen, wurden für mehr als 30 verschiedene Substanzen beschrieben.

Bei Verwendung von Dehydrogenasen liegt das Gleichgewicht für die Substratumsetzung durch  $\text{NAD(P)H}$  (wegen des negativen Redoxpotentials) für die meisten Systeme auf der Seite der reduzierten Analyte. Für die Quantifizierung der Analytkonzentration wird dann die Abnahme der UV-Absorption des Cosubstrates  $\text{NAD(P)H}$  spektrophotometrisch ausgewertet. Dabei erfolgt eine relativ kleine Änderung eines großen Ausgangswertes. Für die Messung der reduzierten Substrate ist häufig das Abfangen eines Reaktionsprodukts erforderlich, um einen vollständigen Umsatz zu erreichen. Hier wird die Zunahme der Absorption von  $\text{NAD(P)H}$  ausgewertet.

Die Anzeige des Sauerstoffverbrauchs in enzymkatalysierten Reaktionen ist mit der von Clark entwickelten membranbedeckten Sauerstoffelektrode und einem Meßverstärker im Vergleich zur optischen  $\text{NAD(P)H}$ -Messung mit einfachen Apparaturen möglich.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs bzw. der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung ist aber auf die verfügbaren Oxidasen beschränkt und wird vor allem zur Bestimmung von Glucose, Lactat, Harnsäure, verschiedenen Aminosäuren und Ethanol erfolgreich genutzt. Dagegen ist für andere wichtige Analyte, für deren Umsetzung keine Oxidasen verfügbar sind, dieses attraktive Meßverfahren nicht direkt anwendbar. Deshalb wird die elektrochemische Messung von  $\text{NAD(P)H}$ , das bei der Analytumsetzung entsteht, mit Hilfe von Redoxmediatoren, z. B. Methylblau oder Nilblau, durchgeführt.

Aus EP 0 054 146 ist ein Verfahren zum Nachweis von  $\text{NAD(P)H}$  oder von Salicylat bekannt, wonach in einer  $\text{NADH(P)H}$ -abhängigen Reaktion Salicylat durch Salicylathydroxylase decarboxyliert wird, aus dem Produkt in Gegenwart von Tyrosinase durch oxidative Kupplung mit einer geeigneten Farbstoffkomponente ein Farbstoff gebildet wird, der photometrisch bestimmt wird.

Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die Meßproben in der Regel durch Filterung oder andere Verfahren vorbehandelt werden müssen. Außerdem muß das teure Cosubstrat  $\text{NADP}^+$  im Überschuß zugesetzt werden und zur Auswertung ist ein ebenfalls teures Spektralphotometer erforderlich.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde ein empfindliches, kostengünstiges und schnelles Verfahren zur enzymatisch-elektrochemischen Bestimmung von Substraten  $\text{NAD}^+$ - und  $\text{NAD(P)}^+$  abhängiger Dehydrogenasen zu entwickeln.

Die Erfindung wird gemäß der Ansprüche realisiert.

Die Erfindung beruht auf der Kopplung des Reaktionsprinzips, nach dem die Bildung von  $\text{NAD(P)H}$  in einen Verbrauch von Sauerstoff und die Erzeugung von Brenzcatechin enzymatisch transformiert wird, mit einer einfachen elektrochemischen Anzeige.

Das Enzym Salicylathydroxylase (EC 1, 14.13.1) benutzt  $\text{NADH}$  oder  $\text{NADPH}$  und Sauerstoff als Cosubstrate für die oxidative Decarboxylierung von Salizylsäure zu Brenzcatechin. Da das Gleichgewicht nahezu vollständig auf Seite der Reaktionsprodukte liegt, erfolgt in dieser Reaktion eine quantitative Umwandlung des  $\text{NAD(P)H}$  zu  $\text{NAD(P)}$  unter Verbrauch einer äquimolaren Menge an Sauerstoff. Damit wird die oxidierte Form des Cosubstrats für eine vorgeschaltete Dehydrogenasereaktion regeneriert, wobei die Analytumsetzung zur Bildung des oxidierten Produkts verschoben wurde.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Analyt mit einer Dehydrogenase in Gegenwart von Salicylathydroxylase umgesetzt und die Bildung oder der Verbrauch von  $\text{NADH}$  und  $\text{NADPH}$  wird als ein quantitatives Stromsignal bei niedrigem Potential an einer Elektrode angezeigt.

Die analytumsetzende Dehydrogenase und die Salicylathydroxylase werden der Meßlösung entweder in gelöster Form zugesetzt und/oder in einer oder mehreren dünnen Schichten vor der Elektrode angebracht.

Beide Enzyme werden bevorzugt in einer Konzentration von 1–5 U/ml (in löslicher Form), bzw. einer Beladung von 0,8–5 U/cm<sup>2</sup> (bei Immobilisierung in einer Membran) verwendet.

Zur Messung von Brenzcatechin wird eine Gold-, Kohle- oder Platinelektrode, die auf ein Potential von + 100 bis + 400 mV polarisiert ist, eingesetzt.

Gegebenenfalls ist die Elektrode zur Anzeige des gebildeten Brenzcatechins mit einer semipermeablen Membran bedeckt.

Erfindungsgemäß ist ebenfalls eine sauerstoffanzeigende Membranelektrode vom Clark-Typ zur Anzeige des  $\text{O}_2$ -Verbrauchs bei der  $\text{NADH}$ - oder  $\text{NADPH}$ -Umsetzung durch Salicylathydroxylase geeignet.

Zur Bestimmung reduzierter Analyte, wie Alkohol, Glucose, Glucose-6-phosphat, Lactat, Mannitol, Sorbitol, Glycerin, Malat, Weinsäure, Glutamat und Aminosäuren, wie Alanin, Phenylalanin und Leucin wird vorzugsweise eine 0,1 bis 5 mM salicylsäurehaltige Meßlösung eingesetzt, der 0,01 bis 5 mM NADP<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup> zugesetzt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird zusätzlich 0,3 bis 5 mM Semikarbazid zugesetzt.

Zur Bestimmung oxidierten Analyte, wie Pyruvat wird vorzugsweise eine 0,1 bis 5 mM salicylsäurehaltige Meßlösung eingesetzt, der 0,1 bis 10 mM NADH bzw. NADPH zugesetzt werden.

Die Kalibrierung der Analytbestimmung bei Verwendung der Dehydrogenasen in gelöster Form wird entweder mit einer Bezugslösung des jeweiligen Analyten, einer NADH- bzw. NADPH-Bezugslösung oder einer Glucosedehydrogenase-haltige Glucose-Bezugslösung durchgeführt, wobei vor der Kalibrierung mit der analyt- oder glucosehaltigen Bezugslösung eine Vorinkubation von 10 bis 60 min zur vollständigen Substratumsetzung erfolgt.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß das teure Cosubstrat NADP<sup>+</sup> nicht im Überschuß zugesetzt werden muß, da es in der zweiten Reaktion regeneriert wird. Statt dessen wird die billige Substanz Salicylsäure im Überschuß zugesetzt, um die Gesamtreaktion anzutreiben.

Bei Immobilisierung der Enzyme in einer Matrix, die NAD(P)<sup>+</sup> speichert, z. B. Gelatine oder Polyurethan, reichen sehr geringe NADP<sup>+</sup>-Konzentrationen (0,02—0,05 mM) in der Meßlösung aus, um maximale Signalamplituden zu erhalten. Eine Probenvorbehandlung (Filterung) ist im Gegensatz zum Verfahren des Standes der Technik auch bei trüben Meßlösungen nicht nötig.

Die Konzentrationsbestimmung ist wesentlich kostengünstiger und schneller zu verwirklichen. So reichen einschließlich Kalibrierung in der Regel 5 Minuten für eine Messung aus.

Der erfindungsgemäß vorzugsweise eingesetzte Sensor zur enzymatisch-elektrochemischen Bestimmung von Substraten NAD<sup>+</sup> und NAD(P)<sup>+</sup> abhängiger Dehydrogenasen ist gekennzeichnet durch eine Brenzcatechin- oder sauerstoffanzeigende Membranelektrode, wobei die Membran zwei Enzyme (Salicylathydroxylase und eine Dehydrogenase) enthält, die auf einer gaspermeablen Membran oder einer semipermeablen Schicht fixiert sind.

Die Enzyme werden bevorzugt in einer Beladung von 0,8—5 U/cm<sup>2</sup>, vorzugsweise 1 bis 1,5 U/cm<sup>2</sup> eingesetzt.

Trotz der sehr niedrigen Beladung des Sensors mit Salicylathydroxylase (etwa 1 U/cm<sup>2</sup>), ist die Empfindlichkeit für Salicylat innerhalb von ca. 1 Woche nahezu konstant.

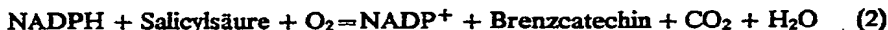
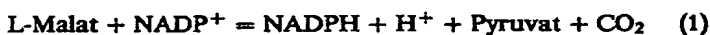
Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren und der Sensor zur Bestimmung von L-Malat (L-Äpfelsäure) und zur Messung von Sorbitol in pharmazeutischen Produkten eingesetzt.

L-Malat ist neben Citronensäure die mengenmäßig wichtigste Säure in Früchten. Wegen ihrer besonderen geschmacklichen Eigenschaften wird sie Fruchtsaftgetränken, Marmeladen, Süßigkeiten usw. zugesetzt. In der Weinbereitung ist die Konzentration dieser Säure ein Maß für den Reifungsvorgang. Bei diesem wird mit zunehmender Lagerzeit immer mehr Weinsäure zu Äpfelsäure und anderen Säuren umgesetzt.

Der Nachweis und die quantitative Bestimmung von L-Malat spielt eine Rolle in der Lebensmittelanalytik, bei der Qualitätskontrolle von frischen Früchten, Fruchtsäften, Marmeladen, bei der Weinherstellung und bei der Herstellung vieler Gärungsprodukte (z. B. Soja-Sauce).

Ein schnelles und kostengünstiges Verfahren steht bisher nicht zur Verfügung.

Die Erfindung ermöglicht die empfindliche, schnelle und preiswerte Bestimmung von L-Malat mit einer Enzymelektrode, unter Verwendung der beiden Enzyme Malatenzym und Salicylathydroxylase und der Cosubstrate NADP<sup>+</sup> und Salicylsäure. Dabei laufen folgende Reaktionen ab:



Pro Mol L-Malat wird ein Mol Sauerstoff verbraucht und ein Mol Brenzcatechin erzeugt. Die Anzeige der L-Malat-Konzentration unter Verwendung einer Elektrode ist damit auf zwei Wegen möglich: Mittels einer einfachen Clark-O<sub>2</sub>-Elektrode oder mittels einer auf + 0,2V bis + 0,4V polarisierten Platin- oder Goldelektrode. In beiden Fällen ist der gemessene Strom proportional zur L-Malat-Konzentration. Als Meßlösung dient ein luftgesättigter Phosphat- oder Tris-Puffer vom pH=7—8. Zusätzlich enthält dieser Magnesiumchlorid in einer Konzentration von 1—2 mM und Salicylsäure in einer Konzentration von 1—5 mM. Das Cosubstrat NADP<sup>+</sup> wird in einer Konzentration von 0,02—0,5 mM eingesetzt, je nachdem, ob die Enzyme in immobilisierter oder löslicher Form eingesetzt werden. Beide Enzyme werden bevorzugt in einer Konzentration von 1—5 U/ml (in löslicher Form), bzw. einer Beladung von 1—5 U/cm<sup>2</sup> (bei Immobilisierung in einer Membran) verwendet. Bei Immobilisierung der Enzyme werden diese nicht verbraucht.

Der besondere Vorteil bei dieser Bestimmungsmethode besteht darin, daß das teure Cosubstrat NADP<sup>+</sup> nicht im Überschuß zugesetzt werden muß, da es in der zweiten Reaktion regeneriert wird. Statt dessen wird die billige Substanz Salicylsäure im Überschuß zugesetzt, um die Gesamtreaktion anzutreiben. Bei Immobilisierung der Enzyme in einer Matrix, die NADP<sup>+</sup> speichert, z. B. Gelatine, reichen sehr geringe NADP<sup>+</sup>-Konzentrationen (0,02—0,05 mM) in der Meßlösung aus, um maximale Signalamplituden zu erhalten. Eine Probenvorbehandlung (Filterung) auch bei trüben Meßlösungen ist nicht notwendig.

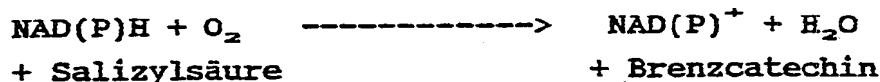
Die Konzentrationsbestimmung von L-Äpfelsäure ist damit ausgesprochen kostengünstig.

Die Messung von Sorbitol, und anderer Alkohole, wie Mannitol, Glycerol, läuft nach folgendem Reaktionsschema ab:

Analytumsatzung durch die Dehydrogenase



Anzeigereaktion mittels Salicylathydroxylase



Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden, die sie jedoch nicht darauf beschränken sollen.

#### Ausführungsbeispiel

##### Beispiel 1

##### Bestimmung von L-Malat in Lösung

Als Enzym-Stammlösung wurden 30 U (10 mg Protein) Salicylathydroxylase und 30 U (15 mg Protein) Malatenzym in 1 ml 0,07 M Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst. Als Meßpuffer wurde 0,07 M Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) mit Magnesiumchlorid (Endkonzentration 1,5 mM), Salicylsäure (Endkonzentration 3 mM) und  $\text{NADP}^+$  (Endkonzentration 0,5 mM) versetzt. 5 µl einer Fruchtsaftprobe (L-Malat-Konzentration = 30 mM) und 945 µl luftgesättigter Meßpuffer werden in eine gerührte, elektrochemische Meßzelle von 1,5 ml Volumen pipettiert, in die eine auf +0,4 V polarisierte Platinelektrode und eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode eintauchen. Der nun gemessene Strom stellt die Basislinie der Messung dar. 50 µl Enzym-Stammlösung werden hinzugegeben und nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten der infolge der Brenzcatechinbildung angestiegene Strom an der Platinelektrode gemessen. Die Differenz aus diesem und dem Basisstrom stellt das Meßsignal dar. Mittels einer Eichkurve wird die in der Probe enthaltene L-Malat-Konzentration berechnet.

##### Beispiel 2

##### Sensor zur Malatbestimmung

3 U Salicylathydroxylase (1 mg Protein) und 3 U Malatenzym (0,15 mg Protein) werden in bekannter Weise in einer Gelatineschicht von 1 cm<sup>2</sup> Fläche fixiert. Nach dem Trocknen der etwa 30 µm dicken Schicht wird ein 2mm × 2mm großes Stück dieser Schicht zwischen einer Folie aus Polyethylen und einer Zellulosemembran (Dicke 15 µm, Porenausschlußgrenze 20.000 Dalton) in bekannter Weise vor eine Clark-Sauerstoffelektrode fixiert. Dieser Sensor wird in eine auf 25°C temperierte gerührte elektrochemische Meßzelle von 3 ml Volumen eingeführt und an einen Potentiostaten angeschlossen.

Als Meßlösung dient 0,07 M Soerensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) mit Magnesiumchlorid (Endkonzentration 1,5 mM), Salicylsäure (Endkonzentration 1 mM) und  $\text{NADP}^+$  (Endkonzentration 0,02 mM). 2,475 ml dieser Meßlösung werden in die Meßzelle pipettiert. Der sich einstellende Grundstrom stellt die Basislinie der Messung dar, der einer L-Malat-freien, luftgesättigten Lösung entspricht. Durch die stufenweise Zugabe von L-Malat, aus einer Stammlösung der Konzentration 50 mM, wird eine Eichkurve aufgenommen. Der gemessene Strom, der ca. 90 s nach Zugabe der Probe konstant ist, spiegelt den O<sub>2</sub>-Verbrauch in der Enzymschicht wider und verringert sich mit jeder Zugabe von Malat. Das Meßsignal ist die Differenz zwischen dem Grundstrom und dem konstanten Strom nach der Probenzugabe. Dieses Signal ist innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 2 µM bis 1 mM proportional zur L-Malatkonzentration in der Meßzelle.

Zur Konzentrationsbestimmung in einer unbekannten Probe wird eine geeignete Probenmenge (z. B. 5 µl eines Fruchtsaftes mit 30 mM L-Malat) eingesetzt, so daß sich das Meßsignal innerhalb des linearen Bereichs befindet.

Zur Blindwert- bzw. Nullwertbestimmung wird eine Meßlösung wie oben beschrieben, allerdings ohne  $\text{NADP}^+$ -Zusatz, in der gleichen Weise eingesetzt.

Aus der Differenz zwischen Blindwert und Meßsignal wird mittels der Eichkurve die tatsächliche Konzentration berechnet.

##### Beispiel 3

##### Bi-Enzymelektrode zur Messung von Sorbitol in pharmazeutischen Produkten

##### Meßapparatur

Die Messungen wurden in einer auf 25°C temperierten Meßstelle aus Acrylglas mit einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Die Enzymelektrode besteht aus der Mikrostabelektrode der Firma Elbau Berlin mit einer Platin-Indikatorelektrode von 0,5 mm Durchmesser und integrierter Ag/AgCl-Gegenelektrode. Zur Gewährung der elektrischen Leitfähigkeit wird ein Elektrolytgel benutzt. Auf die Stirnfläche der Elektrode wird der aus zwei Ringen bestehende Membranhalter (BST Bio Sensor Technologie GmbH Berlin) aufgebracht und die in dieser

Weise präparierte Enzymelektrode mit einer Überwurfmutter in den horizontalen Sensorkanal der Meßzelle eingebracht. Das Elektrodenkabel wird an den Meßverstärker Glukometer GKM (ZWG Berlin) mit einer Polarisationsspannung von  $-600$  mV angeschlossen und die Stromsignale auf einem XY-Schreiber ausgewertet.

#### Herstellung der Enzymmembran

Salicylathydroxylase und Sorbitoldehydrogenase werden gemeinsam in Polyurethan auf einer Dialysemembran aus Zellulose fixiert. Die Enzyme sind kommerzielle Produkte der Firma SIGMA/St. Louis, USA. Sie hatten nach den Angaben des Herstellers eine spezifische Aktivität von  $1,2$  U/mg Salicylathydroxylase und  $50$  U/mg Sorbitoldehydrogenase. Jede Enzymmembran besitzt eine kreisrunde Fläche von  $2-3$  mm Durchmesser, auf der sich die Enzyme mit einer Aktivität von etwa  $0,05$  U Salicylatdehydroxylase und  $2$  U Sorbitoldehydrogenase befinden. Die enzymbeladene Seite der Zellulosemembran wird mit einer Polypropylenfolie (Dicke  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) abgedeckt und gemeinsam zwischen die Spannringe des Membranhalters gespannt.

#### Meßlösungen

Trispuffer von pH 9, der vor der Messung mit Luft gesättigt wird, dient als Grundlösung. Für die Messung von Sorbitol enthält diese Grundlösung  $5$  mM Salicylsäure und  $2$  mM  $\text{NAD}^+$ .

Die Kalibrierung erfolgt mit Bezugslösungen von Sorbitol. Um die Funktion jedes Enzymes getrennt zu charakterisieren, werden Eichkurven für Salicylsäure,  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  aufgenommen. Sowohl bei der Eichung als auch bei der Messung werden jeweils  $10\text{ }\mu\text{l}$  Proben zu  $1$  ml Vorlage in der Meßzelle zugegeben. Nach Einstellung des Meßwertes wird die Meßzelle mit der Grundlösung zweimal gespült und danach die Einstellung des Grundstroms abgewartet.

#### Ergebnisse

Die Zugabe der Substrate Salicylat und Sorbitol bzw. der Cosubstrate  $\text{NADH}$  und  $\text{NADPH}$  führt zu einem Sauerstoffverbrauch der Bi-Enzymelektrode entsprechend dem Reaktionsschema. Die Messung von Salicylat besitzt bei pH 7,5 die größte Empfindlichkeit, was mit dem pH-Optimum der Salicylathydroxylase übereinstimmt. Entsprechend der Reaktionsgleichung der Sorbitolumsetzung nimmt die Empfindlichkeit der Bi-Enzymelektrode für Sorbitol mit steigendem pH-Wert zu. Dieses Verhalten ergibt sich durch die Überlappung der pH-Abhängigkeiten des Gleichgewichts der Sorbitolumsetzung und der Enzymaktivität der Salicylathydroxylase. Die Untersuchungen zur Messung von Sorbitol werden bei einem pH-Wert von 9 durchgeführt. Bei einem Überschuß der erforderlichen Coreaktanden erstreckt sich der lineare Meßbereich für Salicylat bis  $400\text{ }\mu\text{M}$  (in Gegenwart von  $2$  mM  $\text{NADH}$ , für  $\text{NADH}$  bzw.  $\text{NADPH}$  bis  $800\text{ }\mu\text{M}$  und für Sorbitol bis  $1.000$  KLM in der Meßzelle. Die Anstiege der linearen Bereiche der Eichkurve zeigen folgende relative Empfindlichkeiten Sorbitol  $90\%$ , Salicylat  $100\%$ ,  $\text{NADH}$   $50\%$ ,  $\text{NADPH}$   $40\%$ . Diese Abstufung spiegelt die Permeabilität der Enzymschicht für die jeweilige Meßsubstanz wider, wie die Parallelität zur Molmasse zeigt. An der hohen Empfindlichkeit der Sorbitolmessung ist auch die Regenerierung des  $\text{NAD}^+$  in der Salicylathydroxylase-Reaktion beteiligt.

Die Messung von Sorbitol besitzt eine untere Nachweisgrenze von  $10\text{ }\mu\text{M}$ , die vor allem durch das Rauschen der Grundlinie bei der Sauerstoffmessung bedingt ist. Für das Erreichen des stationären Meßwertes sind  $40$  sec. erforderlich, ein kompletter Meßzyklus dauert  $2$  min. Damit ist ein Probendurchsatz von  $30$  Messungen pro Stunde möglich. Der Variationskoeffizient für eine Serie von  $20$  identischen Sorbitolproben in  $0,5$  mM wurde mit  $2,7\%$  ermittelt.

Trotz der sehr niedrigen Beladung des Sensors mit Salicylathydroxylase (etwa  $1\text{ U/cm}^2$ ), ist die Empfindlichkeit für Salicylat und die Cosubstrate  $\text{NADH}$  bzw.  $\text{NADPH}$  innerhalb von  $5$  Meßtagen nahezu konstant. Die geringfügige Erhöhung des Meßsignals gegenüber dem Zustand nach der Sensorpräparation ist ein von anderen Sensoren bekannter Effekt, der durch mechanische Veränderungen der Enzymschicht hervorgerufen werden.

Die Eignung des Substratsensors wurde bei der Untersuchung folgender Apothekenprodukten nachgewiesen:

Vidisic®, Tränenersatzflüssigkeit  
Defarin®, Kautablette Rennie®  
Intacta® Hustenmischung

Nach Auflösen definierter Probemengen im Meßpuffer erfolgte die Sorbitolmessung mit der Bi-Enzymelektrode und die Konzentrationsermittlung über eine Eichkurve für Sorbitol. Die mit der Bi-Enzymelektrode bestimmten Werte lagen innerhalb von  $97$  bis  $103\%$  der von den Herstellern angegebenen Gehalte.

Die neu entwickelte Bestimmung von Sorbitol besitzt gegenüber der im DAB 1996 vorgeschriebenen Titration mit Perjodat und Arsenit nach Malaprade (DAB 9, Bd. I, S. 524) wesentliche Vorteile:

- die Meßprozedur ist einfach,
- einschließlich der Kalibrierung erfordert eine Messung nur  $5$  min.,
- die Verwendung des toxischen Arsenits entfällt,
- das gleiche Sensorprinzip kann auf andere für das Apothekenwesen wichtige Analyte, z. B. Mannitol, Glycerol, Glukose, aber auch Acetylsalicylsäure, erweitert werden.

Die Bestimmung der  $\text{NAD(P)H}$ -Konzentration mit Hilfe einer solchen Meßapparatur stellt vor allem für den dezentralen Einsatz eine günstige Alternative zu der etablierten Methode zur Bestimmung von Substanzen mit Alkohol- oder Aldehydgruppen dar.

1. Verfahren zur enzymatisch-elektrochemischen Bestimmung von Substraten  $\text{NAD}^+$  - und  $\text{NAD(P)}^+$  abhängiger Dehydrogenasen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Analyt mit einer Dehydrogenase in Gegenwart von Salicylathydroxylase umgesetzt wird und die Bildung oder der Verbrauch von NADH oder NADPH als ein quantitatives Stromsignal bei niedrigem Potential an einer Elektrode oder mit einer Clark- $\text{O}_2$ -Elektrode angezeigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die analytumsetzende Dehydrogenase und die Salicylathydroxylase in gelöster Form der Meßlösung zugesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die analytumsetzende Dehydrogenase und/oder die Salicylathydroxylase in einer oder mehreren dünnen Schichten vor der Elektrode angebracht werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Elektrode eine Gold-, Kohle- oder Platinelektrode, die auf ein Potential von + 100 bis + 400 mV polarisiert ist, eingesetzt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine sauerstoffanzeigende Membranelektrode vom Clark-Typ zur Anzeige des  $\text{O}_2$ -Verbrauchs bei der NADH- oder NADPH-Umsetzung durch Salicylathydroxylase eingesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrode mit einer semipermeablen Membran zur Anzeige des gebildeten Brenzcatechins bedeckt ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung reduzierter Analyte, wie Alkohol, Glucose, Glucose-6-phosphat, Lactat, Mannitol, Sorbitol, Glycerin, Malat, Weinsäure, Glutamat und Aminosäuren, wie Alanin, Phenylalanin und Leucin, eine 0,1 bis 5 mM salicylsäurehaltige Meßlösung eingesetzt wird, der 0,01 bis 5 mM  $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{NADP}^+$  zugesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich 0,3 bis 5 mM Semikarbazid zugesetzt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung oxidierten Analyte, wie Pyruvat, eine 0,1 bis 5 mM salicylsäurehaltige Meßlösung eingesetzt wird, der 0,1 bis 10 mM NADH bzw. NADPH zugesetzt werden.
10. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Kalibrierung der Analytbestimmung bei Verwendung der Dehydrogenasen in gelöster Form entweder eine Bezugslösung des jeweiligen Analyten, eine NADH- bzw. NADPH-Bezugslösung oder eine Glucosedehydrogenase-haltige Glucose-Bezugslösung benutzt wird, wobei vor der Kalibrierung mit der analyt- oder glucosehaltigen Bezugslösung eine Vorinkubation von 10 bis 60 min zur vollständigen Substratumsetzung erfolgt.
11. Sensor zur enzymatisch-elektrochemischen Bestimmung von Substraten  $\text{NAD}^+$ - und  $\text{NAD(P)}^+$  abhängiger Dehydrogenasen, gekennzeichnet durch eine Brenzcatechin- oder sauerstoffanzeigende Membranelektrode, wobei die Membran Salicylathydroxylase und eine Dehydrogenase in einer Matrix, die gegebenenfalls  $\text{NADP}^+$  speichert, enthält.
12. Sensor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran zusätzlich eine semipermeable Schicht enthält.
13. Sensor nach Anspruch 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme in einer Belastung von 0,8—5  $\text{U/cm}^2$ , vorzugsweise 1 bis 1,5  $\text{U/cm}^2$  fixiert sind.